

Thesis Title Antioxidant Activity, Antibacterial Activity Against Acne-inducing Bacteria and HPLC Analysis of Green Tea Extract and Its Cream Product

Author Miss Pimbootsaporn Singha-Aussavarat

Degree Master of Science (Pharmaceutical Sciences)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Surapol Natakankitkul

Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Panee Sirisa-ard

Member

Asst. Prof. Dr. Suchart Punjaisee

Member

ABSTRACT

This study was to determine the antioxidant activity, antibacterial activity of acne-inducing bacteria and HPLC analysis of green tea extract and its cream product. Dried leaves of green tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) were extracted by a solvent extraction method with chloroform and then ethyl acetate. Then the solution was evaporated by rotary evaporation. The characteristics of crude extract were a brown-yellow highly viscous liquid and its average yields were 10.79. Antioxidant activity of crude extract was tested by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) radical scavenging assay and 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radical decolorization by method. The result revealed that the crude extract presented high potent antioxidant activity in both tests. IC₅₀ was found to be 59.34 µg/mL and TEAC was found to be 1.0003 g/g, respectively. 2 mg/mL of GTE cream also had strong antioxidant activity, the percentage of inhibitory effect were found to be 97.72 and 98.15, respectively. Antibacterial activity of GTE was tested by broth dilution method. Minimum inhibitory concentration (MIC) against *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) and *Propionibacterium acnes* (ATCC11827) were found to be

0.828, 1.622 mg/mL, respectively. Then the crude extract was incorporated into o/w cream base in concentration 1%w/w. Antibacterial activity of green tea extract (GTE) cream was tested by the agar well diffusion method on the same bacteria strains, inhibition zone were found to be 15.25, 16.00 mm, respectively. Identification of 1 mg/mL crude extract were tested by HPLC assay with Cosmosil C18 column, mobile phase was mixed with acetonitrile and buffer pH3, gradient elution, UV detector at 280 nm. The result showed that the quantity active main compounds are Caffeine (CF), Epicatechin (EC), Epigallocatechingallate (EGCG), Epicatechingallate (ECG) were found to be 12.76, 109.05, 137.41 and 171.32 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The GTE cream that were found the same of active main compounds are 12.57, 129.03, 112.69 and 210.11 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Anti-irritation activity of the crude extract at 3 mg/mL/ear was investigated by ethyl phenylpropionate (EPP)-induced ear edema method with a male of Sparque-dawley mices. The result revealed that the crude extract has significantly anti-irritation activity at 15, 30, 60 and 120 minutes, and showed the percentage of ear edema inhibition were 70.00, 59.30, 46.79 and 64.29, respectively. The GTE cream 1 % w/w exhibited no irritation after tested by human 4h patch test and revealed chemical and physical stabilities when stored in stress conditions (Heating-cooling cycles). Furthermore, the GTE cream exhibited significantly higher antioxidant activity, antibacterial activity than cream base in both before and after stability tests. The results indicate that the GTE cream may be used as an alternative to treat acne in the future.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว และการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของสารสกัดและครีมจากชาเขียว

ผู้เขียน นางสาวพิมพ์พร สิงห์สุวรรณ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. สุรพล นชการกิจกุล ประธานกรรมการ

รศ.ดร. พานี ศิริสะอาด กรรมการ

ผศ.ดร. สุชาติ ปิ่นจัยสีห์ กรรมการ

บทคัดย่อ

ผู้วิจัยได้ศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิว และการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของสารสกัด และ ผลิตภัณฑ์ครีมจากชาเขียว พร้อมทั้งได้ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเกิดความระคายเคืองของสารสกัดชาเขียว โดยการนำใบชาเขียวแห้ง (*Camellia sinensis* var. *assamica*) มาสกัด ด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์มและเอทิลอะซิเตต นำสารสกัดไประเหยตัวทำละลายออกโดยวิธี rotary evaporation ได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืด สีน้ำตาลเหลืองเข้ม มีผลผลิตเท่ากับร้อยละ 10.79 การศึกษาฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันของสารสกัดโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH[•]) radical scavenging assay และ 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

(ABTS) free radical decolorization method พบว่าสารสกัดชาเขียวมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 59.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ ค่า TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) เท่ากับ 1.003 กรัมต่อ Trolox 1 กรัม และเมื่อนำตำรับครีมจากสารสกัดชาเขียวความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมาศึกษาฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันด้วยวิธีเดียวกันพบว่ามีฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน เท่ากับร้อยละ 97.72 และ 98.15 ตามลำดับ การศึกษาฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดสิวโดยวิธี broth dilution method พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) ของเชื้อ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 29213 และ *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC11827 มีค่าเท่ากับ 0.828 และ 1.662 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ นำสารสกัดชาเขียวที่ได้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ครีมเพื่อรักษาสิวโดยใช้สารสกัด ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัม โดยเตรียมครีมในรูปแบบชนิดน้ำมันในน้ำ จากนั้นนำครีมที่ได้มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดข้างต้น ด้วยวิธี agar well diffusion method พบว่าครีมจากสารสกัดชาเขียวมีค่า inhibition zone เท่ากับ 15.25 และ 16.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดชาเขียวความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC) ด้วยคอลัมน์ Cosmosil C18 และใช้วัฏภาคเคลื่อนที่เป็นส่วนผสมของ acetonitrile และ buffer pH3 แบบ gradient elution ทำการตรวจวัดสารที่แยกได้โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตเมทรี (UV) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบองค์ประกอบสำคัญในการออกฤทธิ์ของสารสกัดชาเขียว ดังนี้ caffeine (CF), epicatechin (EC), epigallocatechingallate (EGCG), epicatechingallate (ECG) เท่ากับ 12.76, 109.05, 137.41 และ 171.32 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และครีมสารสกัดชาเขียวความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก เมื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบโดยวิธีเดียวกันกับสารสกัด พบองค์ประกอบสำคัญในการออกฤทธิ์เช่นเดียวกันดังนี้ caffeine (CF), epicatechin (EC), epigallocatechingallate (EGCG), epicatechingallate (ECG), เท่ากับ 12.57, 129.03, 112.69 และ 210.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาฤทธิ์ด้านการระคายเคืองของสารสกัดชาเขียว ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในใบหูของหนูหนึ่งข้าง โดยวิธี ethyl phenylpropiolate (EPP) induced ear edema test โดยการทดสอบในหนูพันธุ์ sprague-dawley เพศผู้ พบว่า เวลาที่ 15, 30, 60 และ 120 นาที สารสกัดชาเขียวสามารถยับยั้งการระคายเคืองได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าการยับยั้งการเกิดความระคายเคืองเท่ากับร้อยละ 70.00, 59.30, 46.79 และ 64.29 ตามลำดับ การศึกษาการเกิดความระคายเคืองในอาสาสมัครด้วยวิธี human 4h patch test ของครีมจากสารสกัดชาเขียวความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก พบว่า ไม่ทำให้เกิดความระคายเคืองต่อผิวหนังใน

อาสาสมัคร ดำรับครีมที่ได้มีความคงตัวทั้งทางด้านเคมีและกายภาพเมื่อทดสอบในสภาวะเร่งด้วยวิธี Heating-cooling cycles และยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เกิดสิว มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี ทั้งก่อนและหลังการทดสอบสอบความคงสภาพ ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าครีมจากสารสกัดชาเขียว น่าจะเป็นแนวทางเลือกที่ดีอีกทางหนึ่งที่สามารถนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อรักษาสิวในอนาคตต่อไป



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved